

**Eine Methode zur Messung der Verformbarkeit
einzelner Erythrozyten**

Wolfgang Schlick

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551911_0023

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. K. Kramer

Eine Methode zur Messung der Verformbarkeit einzelner
Erythrozyten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Schlick

aus
München

Jahr
1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Priv.Do. Dr. H. Schmid-Schönbein

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Kramer

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 2. 1975



I. Zusammenfassung

Für das Fließverhalten des Blutes in der Mikrozirkulation ist die Deformierbarkeit der Erythrozyten (im folgenden RBZ, Rote Blut-Zellen genannt) von großer Bedeutung, da die Durchblutung in der Endstrombahn stark von der Passagesfähigkeit der im Mittel $7,5\text{ }\mu\text{m}$ breiten Zellen durch die nur $4\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$ weiten Kapillaren abhängt. Eine einzige rigide Zelle kann eine Kapillare vollständig verschließen. Somit ist die Messung der Verformbarkeit der RBZ unter definierten Bedingungen in vitro von hohem Interesse für die Hämorheologie.

Nachdem allen bisher bekannten Meßmethoden theoretische oder praktische Mängel anhaften, entschlossen wir uns, einen Vorschlag von BRAASCH (2) aufgreifend, die Passagedauer (künftig PD genannt) zu messen, die eine RBZ benötigt, um eine Pore von z.B. $4\text{--}5\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser zu passieren.

Die Messung der Passagedauer erfolgt in einer Pore eines Nucleopore®-Membran-Filters mit einem Durchmesser von $5\text{ }\mu\text{m} \pm 10\%$ und $11\text{ }\mu\text{m}$ Länge. Die Folie mit der Pore befindet sich in einer Meßkammer, die damit in einen oberen und unteren Anteil getrennt wird. Eine definierte Druckdifferenz zwischen beiden Teilen treibt die RBZ vom oberen Kammerteil in den unteren. Die PD wird elektrisch gemessen, dadurch, daß die Zellen beim Passieren den elektrischen Widerstand der Pore erhöhen. Mit Hilfe einer angelegten Spannungsquelle und eines Vorwiderstandes entstehen dadurch Spannungsänderungen. Diese Impulse werden elektronisch verarbeitet und in einem Vielkanalanalysator als Zeithistogramm gespeichert. Die Zeit zwischen Beginn und Ende eines Impulses ist die Passagedauer.

Messungen wurden bei verschiedenen Drucken und verschiedenen Parametern durchgeführt, so daß sich in einem Zeit-Druck-Diagramm Kurvenscharen ergaben. Parameter waren Temperatur, pH, ATP-Gehalt u.a.. Die Gestalt der Spektren ist Gauß'schen Verteilungskurven ähnlich. Für die Auswertung wurde der häufigste Wert ermittelt und ein ungefähres Verhältnis von rigiden zu normalen Zellen bestimmt.

Für weitere Verbesserungen der Methoden wurden noch Vorschläge gemacht.

II. Einleitung

Für Lebewesen mit geschlossenem Blutkreislauf ist die Funktion der Mikrozirkulation von elementarer Bedeutung, weil hier

1. der Stoff- und Gasaustausch der Körperzellen stattfindet,
2. dem strömenden Blut lokal der größte spezifische Widerstand entgegengesetzt wird.

Die Fließfähigkeit des Blutes in der Endstrombahn ist abgesehen von den Parametern des Gefäßsystems wie treibender Druck und Querschnitt, von 2 Komponenten abhängig:

1. Viskosität des Plasmas

Das reine Plasma ist eine Newton'sche Flüssigkeit, d.h. die Viskosität ist nicht von der Schubspannung, also den Strömungsbedingungen abhängig

2. der Deformierbarkeit der zellulären Bestandteile, also vor allem der RBZ.

Eine RBZ ist eine Zelle ohne starre innere Struktur. Das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen ist bedeutend größer als bei einer Kugel von gleichem Volumen. In den zylindrischen Gefäßen bildet sich eine (Poiseuille'sche) Strömung aus, die nicht wirbelfrei ist ¹⁾ (Budó (3)).

Die erstgenannte Eigenschaft erlaubt es der RBZ sozusagen, an der Strömung teilzunehmen, indem sie sich der Rotation der Strömung mit einer eigenen "Panzerkettenrotation" der Membran um den Zellinhalt anpaßt (16). Der visköse Zellinhalt (35 %ige Hämoglobininlösung) wird dabei ebenfalls in Strömung versetzt. Die Größe der Biegeelastizität der Membran und die Zähigkeit des Zellinhaltes sind damit die entscheidenden Faktoren für die Viskosität des Blutes. Ein starrer Körper würde durch die Rotation der Strömung ständig um wenigstens eine Hauptachse gedreht und damit die Strömung bedeutend stärker stören, d.h. die Gesamtviskosität erhöhen.

$$\begin{aligned}
 1) \underline{v} &= (u, v, w) & u &= v = 0 & \text{Strömungsgeschwindigkeit} \\
 w &= \frac{\Delta P (R^2 - r^2)}{4 \eta l} \\
 \text{rot}_x \underline{v} &= \frac{\delta w}{\delta y} = - \frac{\Delta P}{4 \eta l} y & \text{rot}_y \underline{v} &= - \frac{\delta w}{\delta x} = \frac{\Delta P}{4 \eta l} x
 \end{aligned}$$

Die Verformbarkeit ist von besonderer Bedeutung für die Passage durch die Kapillaren. Die Kapillaren der Säuger haben mit $4,5 \mu\text{m}$ (Wiedemann (17)) einen erheblich geringeren Durchmesser als die RBZ, die im Mittel $7,5 \mu\text{m}$ Durchmesser haben. Während der Kapillarpassage müssen sie sich beträchtlich verformen. Wegen des großen Oberfläche/Volumen-Verhältnisses ist das sehr gut möglich, da während der Verformung keine Membrandehnung, (was sehr große Kräfte erfordern würde), sondern nur eine Membranbiegung auftritt (Fung (5)). Die Verformbarkeit hängt somit von der Zähigkeit des Zellinhaltes und der Elastizität der Membran ab.

Zur Messung der Fließeigenschaften oder Verformbarkeit von RBZ wurden bisher mehrere Methoden entwickelt. Es wurde die Fluidität (d.h. die reziproke Viskosität) von konzentrierten Erythrozytensuspensionen bis zu einem Hct von 95 % gemessen. Dabei herrscht die Vorstellung, daß der Einfluß des Plasmas weitgehend beseitigt ist und sich die Gesamtfluidität aus der Fluidität der einzelnen RBZ ergibt.

Eine andere Methode bestimmt die Verformbarkeit, indem eine RBZ ganz oder teilweise in eine Mikropipette eingesogen und der dazu nötige Druck gemessen wird.

Beide Methoden haben den Nachteil, daß die Versuchsbedingungen völlig verschieden von den Strömungsverhältnissen in vivo sind. Gegenüber den Strömungsverhältnissen in den Kapillaren wirkt sich bei der ersten Methode der Einfluß der Membran zu wenig aus, bei der zweiten dagegen zu stark. Außerdem wird bei der zweiten Methode die Dynamik nicht berücksichtigt.

Eine weitere Verbesserung stellten Versuche dar, verdünnte Erythrozytensuspensionen (z.B. Hct 2-10%) durch Faser-oder Porenfilter zu treiben. Dabei wird aus der Zeit, die ein vorgegebenes Volumen für die Passage benötigt, die Flußrate bestimmt. Da Faserfilter sehr schlecht definierbare "Poren" besitzen, (Schmid-Schonbein (8)) wurden auch sog. Nuclepore[®]-Filter eingesetzt, die recht einheitliche, runde Poren von z.B. $5 \mu\text{m}$ Durchmesser und eine Toleranz von $\pm 10\%$ besitzen (8)(10).

Obwohl in diesen Filterporen die Strömungsverhältnisse in etwa denen von Kapillaren in vivo angepaßt sind, haben auch diese Methoden entscheidende Nachteile. Aus meßtechnischen Gründen müssen die treibenden Drucke und damit die Schergrade bedeutend größer als die physiologischen sein. Das kann zu einer

Verschleierung von Effekten führen, die bei normalen Werten auftreten können. Der wesentliche Nachteil aber besteht darin, daß eine partielle oder totale Verstopfung der Poren durch einige wenige rigide Zellen oder sonstige nicht fluide Bestandteile möglich ist und somit fluide Zellen nicht mehr passieren können. Damit wird zumindest eine erhöhte Passagezeit vorge-täuscht.

Die hier entwickelte Methode vermeidet diese beiden Nachteile und gestattet es außerdem Verteilung, Mittelwert, Standardabweichung usw. des Zeithistogrammes aus der Messung der PD einzelner RBZ zu bestimmen. Ähnlich wie bei der letztgenannten Methode passieren auch hier die RBZ ein Nucleporefilter[®], allerdings wird hier die Passagedauer jeder einzelnen RBZ gemessen und von einem Vielkanalanalysator gespeichert. Diese Art der Messung ermöglicht es, beliebig kleine treibende Drucke zu verwenden, sodaß man im physiologischen Bereich messen kann. Der gesamte Meßvorgang findet an einer einzigen Pore statt. Mehrere Kontrollmöglichkeiten gestatten es festzustellen, ob die Pore frei durchgängig oder verstopft ist. Ist die Pore ganz oder teilweise verstopft, wird der Meßvorgang unterbrochen, die Pore gereinigt und die Messung kann ohne Verfälschung fortgeführt werden.

Die Messung der Passagedauer ist sowohl von theoretischem wie auch praktischem Interesse. Durch objektive Messung des Einflusses von Parametern wie Osmolarität, pH, Druck, Viskosität usw. kann ein möglicher Einfluß der Erythrozytenflexibilität auf die Zirkulation des Blutes in den Endstromgefäßen ermittelt werden. Von besonderem praktischen Interesse sind eventuelle pathologische Veränderungen der Fluidität einzelner RBZ oder der ganzen Population. Solche Veränderungen wurden gefunden bei Stoffwechselentgleisungen beim (nicht eingestellten) Diabetes mellitus (Volger (14), Ditzel (4)). Es ist vermutet worden, daß die im Spätstadium des Diabetes auftretenden Mikroangiopathien möglicherweise durch rheologische Veränderungen des Blutes mitbestimmt werden. Auch ist vermutet worden, daß bei hämolytischen Anämien eine vermehrte Rigidität der Zellen ihren

beschleunigten Abbau verursachen könnte und damit zentraler Schritt in der Pathogenese dieser Erkrankung sein könnte. Diese wenigen Beispiele verdeutlichen die Notwendigkeit zu einer verbesserten Messung der Erythrozytenflexibilität.

III,1 Meßkammer

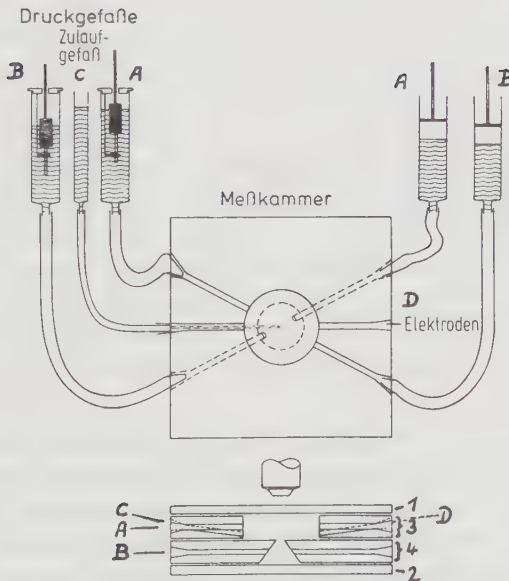


Abb. 1. Frontansicht und Querschnitt der
Meßkammer

Die Meßkammer besteht aus 4 Plexiglasplatten (Abb.1). Plexiglas eignet sich wegen seiner Durchsichtigkeit, da es leicht zu bearbeiten und elektrisch nicht leitend ist sehr gut zu diesem Zweck. Die oberste(1) und unterste(2) Platte sind nur 3mm stark und bilden Deckel und Boden der Kammer. In den beiden mittleren Platten (3 und 4) befinden sich zentral die Lamina der oberen und unteren Kammerteile. Zur sterilen Abgrenzung zwischen beiden ist in(4) eine kegelförmige mit der Spitze nach oben gerichtete Bohrung eingesetzt. Das zentrale Loch in der Spitze dieses Kegels (1,5mm Durchmesser) wird mit einer Nucleopore[®]-Folie, die die obere von der unteren Kammer trennt (in Abb. 1 nicht gezeigt), überklebt. Die Nucleopore[®]-Folie (General Electric, Pleasantown, Kalifornien USA), ist nach Angaben des Herstellers 11,5 µm dick und besitzt (wie durch eigene Messungen nachgeprüft) etwa 2×10^6 runde Löcher pro cm², die einen Durchmesser von $5 \pm 0,5$ µm (Schmid-Schonbein (8)) besitzen. Wie auf Seite 7 dargestellt, werden alle Löcher mit einer Ausnahme mit Kunststofflack (siehe unten) verschlossen. Somit stellt das verbleibende Loch die einzige Verbindung zwischen dem oberen und unteren Kammerteil dar. RBZ, die in den oberen Teil eingeführt werden, können nur durch dieses Loch in den unteren Teil gelangen. Damit das geschieht, wird der statische Druck im oberen Kammerteil höher gehalten als im unteren. Funktionell gesehen ist die Kammer ein Modell für den Kreislauf (allerdings ohne Rezirkulation) mit arteriellem Anteil (= obere Kammer, höherer Druck), Mikrozirkulation (= Pore) und venösem Anteil (= unterer Kammerteil, niedriger Druck).

Die Kammerwände besitzen Bohrungen (A und B) für den Zulauf der Flüssigkeiten (= physiolog. Kochsalzlösung, Serum oder Plasma) und eine gesonderte Zufuhr (C) im oberen Kammerteil für die Erythrozytensuspension, damit die RBZ in einer Kanüle direkt vor das Meßloch geschleust werden können. Je eine weitere Bohrung (D) im oberen und unteren Kammerteil dient zum Einsetzen der Elektroden. Die Flüssigkeitsbehälter dienen gleichzeitig zur Regulierung der Druckdifferenz. Durch Anheben bzw. Senken der Behälter und damit des Flüssigkeitsniveaus wird die Höhe eingestellt. Die

Anzeige erfolgt durch Schwimmer mit Zeigern, deren Höhe auf einer vertikalen Skala abgelesen wird.

Die Meßkammer ist unter einem Mikroskop montiert. Damit kann die Messung optisch überwacht werden, Der Kondensor befindet sich außerhalb des Abschirmgehäuses. Das Objektiv ragt durch eine Bohrung in das Gehäuse. Ein 32/0,40 Objektiv der Firma Leitz (Wetzlar) mit einem Arbeitsabstand von ca 6 mm gestattet es, das Objektiv außerhalb der Kammer zu lassen.

Herstellung der Pore

Ein sauberer Objektträger wird hauchdünn eingefettet (z.B. mit Vaseline). Darauf wird eine Nuclepore[®]-Folie gelegt. Die dünne Fettschicht gewährleistet ein gutes und gleichmäßiges Haften der Folie auf dem Objektträger, ohne Luftblasen einzuschließen. Außerdem verhindert sie ein Überschwemmen der Folie mit Lösungsmittel des Lackes, was sonst wegen des Kapillarspaltes zwischen Folie und Objektträger leicht geschieht. Dann wird der Objektträger auf das Support eines invertierenden Mikroskopes gelegt mit der Folie nach oben. Die Optik befindet sich auf der Unterseite, so daß die Folie von oben frei zugänglich ist. Die Beleuchtung erfolgt schräg von oben und die Betrachtung damit durch den Objektträger hindurch, was aber bei Objektiven von 4 x und 16 x (Okular 10 x) nicht stört. In einen Mikromanipulator, der in 3 Dimensionen verstellbar ist, wird eine gezogene Glaskapillare eingesetzt. Die Kapillare hat an der Spitze einen Durchmesser von etwa 50 µm. Die Spitze ist plan geschliffen. In die Kapillare wird Lack eingefüllt und nach Aufsetzen der Kapillarenspitze auf die Folie ein Bereich von etwa 1,5 mm Durchmesser lackiert, wobei in der Mitte eine Pore ausgespart wird, was bei der 160-fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop gut möglich ist. Beim Aufsetzen der Kapillare fließt der Lack sofort auf die Folie, genau wie bei einer Füllfeder die Tinte auf das Papier, wenn der Lack die richtige Konsistenz hat. Es wird handelsüblicher Kunststofflack (z.B. Glasomax, Glasurit-Werke) benutzt, der mit Terpentinersatz im Verhältnis 7 : 1 gemischt

wird. Nach dem Trocknen des Lackes wird die Folie vom Objektträger abgezogen, die lackierte Fläche ausgeschnitten und auf einen Klebstreifen geklebt, aus dem ein Loch von 0,7 mm Durchmesser ausgestanzt wurde. Die freie Pore soll etwa in der Mitte des Loches sein. Anschließend wird der Rand des Loches noch mit Lack bedeckt und damit eine dichte Verbindung zwischen Klebstreifen und Folie hergestellt, sodaß keine Leckströme entstehen können.

III,2 Elektronik (Abb. 2)

Die Messung der PD einer RBZ durch die Pore erfolgt elektrisch. Im oberen und unteren Kammerteil liegt je eine Elektrode. Die Flüssigkeit in der Kammer stellt einen Ohm'schen Widerstand dar, der fast ausschließlich durch die Flüssigkeit in der Pore selbst gebildet wird. Mit einer elektrischen Leitfähigkeit von ca 70 Ωcm beträgt der Kammerwiderstand also etwa 350 K Ω nach der Formel: $R = \sigma \frac{l}{F}$

$$\frac{1}{F} = 10^{-3} \text{ cm}$$

$$F = nr^2 = 2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2$$

Tatsächlich ist er geringfügig höher, da ja das Kammerlumen auch einen Widerstand größer 0 besitzt.

Eine RBZ hat einen bedeutend höheren Widerstand. Deshalb ist der Kammerwiderstand größer, solange sich eine RBZ in der Pore befindet. Zusammen mit einem festen Vorwiderstand bildet der Kammerwiderstand einen Spannungsteiler. Die über dem Kammerwiderstand abfallende Spannung ändert sich daher entsprechend dem Kammerwiderstand. Diese Spannungsänderung (= Impuls) wird über eine Kapazität abgenommen und elektronisch weiterverarbeitet. Der entstehende Impuls hat etwa die Form einer zugespitzten Glockenkurve. Der allmähliche Anstieg entspricht der Tatsache, daß der Kammerwiderstand bereits ansteigt, bevor sich die RBZ in der Pore befindet auf Grund der Verdrängung des bereits vor der Pore eingeschnürten elektrischen Feldes. Dadurch erscheint die Pore elektrisch gesehen etwas länger.

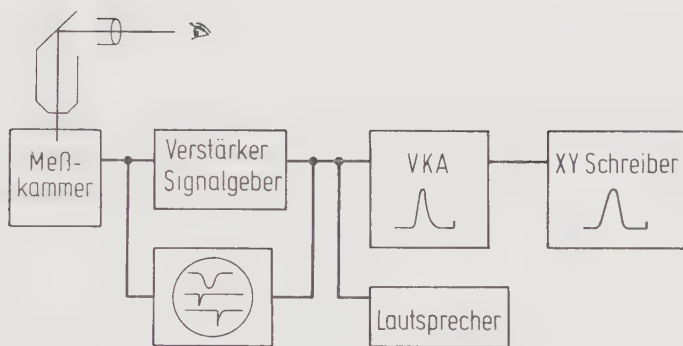


Abb. 2. Blockschaltbild der Meßanordnung
(Einzelheiten s. Text).

Für die elektronische Registrierung der Passagedauer muß der Impuls noch geformt werden. Zur Erfassung des Anfangs- und Schlußzeitpunktes wird ein Verstärker so weit übersteuert, daß ein Rechteckimpuls entsteht. Durch Differentiation werden aus den beiden Flanken des Rechteckimpulses Nadelimpulse gebildet, die für die Nachfolgeelektronik das Start- und Stoppsignal liefern. Diese Signale entsprechen also dem Eintreten und Verlassen der Pore durch eine RBZ.

Von großer Bedeutung ist die Höhe der an der Kammer angelegten Spannung (= Meßspannung). Aus zwei Gründen muß sie möglichst niedrig sein:

1. Um eine Verfälschung der Messung durch Elektrophorese zu vermeiden. Durch Umpolen der Meßspannung, d.h. Passage mit und gegen Feldrichtung läßt sich dieser Fehler korrigieren, es sind dann aber zwei Messungen nötig.
2. Um die Aufheizung in der Pore möglichst gering zu halten

Zu 1. Die Geschwindigkeit, die eine RBZ allein auf Grund des elektrischen Feldes E annimmt, ist:

$$u = \mu \cdot E \qquad \mu = \text{Beweglichkeit}$$

Für frei in einer physiologischen Kochsalzlösung schwimmende RBZ ist (Mehrishi (6)):

$$\mu = 1,08 \frac{\mu\text{m cm}}{\text{sec V}} .$$

Innerhalb der Pore läßt sich diese Formel wegen der Wandreibung und Verformung, d. h. verändertes μ , nicht anwenden und deshalb nicht zur Korrektur der Passagedauer ausnutzen. Jedoch kann man aus den Passagezeiten mit und gegen die Feldrichtung die Zeit errechnen, die ohne Feld zustande gekommen wäre.

v = Geschwindigkeit allein hervorgerufen durch Druckdifferenz

u = Geschwindigkeit " " " Feldstärke

s = Weg.

Gesucht wird $t_0 = \frac{s}{v}$ = Zeit, die ohne Einfluß durch das Feld zustande kommen würde.

I Passage in Feldrichtung: $v + u = \frac{s}{t_1}$

II gegen Feldrichtung: $v - u = \frac{s}{t_2}$

$$I + II: 2v = \frac{s}{t_1} + \frac{s}{t_2} = s \frac{t_1 + t_2}{t_1 \cdot t_2}$$

$$2 \frac{t_1 t_2}{t_1 + t_2} = \frac{s}{v} = t_0$$

Ein Beispiel zeigt, daß t_0 umso weiter vom Mittelwert t_m von t_1 und t_2 entfernt liegt, je größer die Differenz von t_1 und t_2 ist.

Beispiel: $t_1 = 10 \text{ msec}$ $t_2 = 11 \text{ msec} \Rightarrow t_0 = 10,5 \text{ msec}$ $t_m = 10,5 \text{ msec}$

$t_1 = 10 \text{ msec}$ $t_2 = 20 \text{ msec} \Rightarrow t_0 = 13,3 \text{ msec}$ $t_m = 15 \text{ msec}$

Das elektrische Feld in der Kammer hat folgende Gestalt:

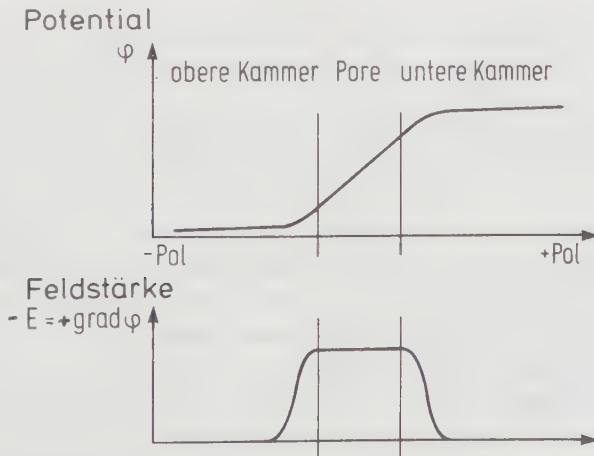


Abb. 3. Schematische Darstellung des Potentials über die Pore bzw. der Feldstärke entlang des Eintritts, Durchtritts und Austritts der RBZ in die Pore.

Zu 2: Da die Pore nahezu den gesamten Widerstand der Kammer ausmacht, wird durch den Strom in ihr auch fast die ganze Joule'sche Wärme erzeugt.

Für die Temperaturerhöhung soll eine obere Grenze angegeben werden. Die Wärmeableitung durch Flüssigkeit und Folie ebenso wie die Konvektionsströmungen werden dabei nicht berücksichtigt, da zur Berechnung ziemlich komplizierte partielle Differentialgleichungen benötigt werden und die Wärmeleitfähigkeit der Folie nicht bekannt ist. Dieser Fehler macht sich bei großen Temperaturerhöhungen sicher bemerkbar, bei geringen, wie sie hier auftreten aber nur sehr wenig.

Die Leistung, die der elektrische Strom in der Pore in Wärme umsetzt, beträgt:

$$N = \frac{U^2}{R}$$

U = Spannungsabfall längs der Pore
R = Widerstand der Pore

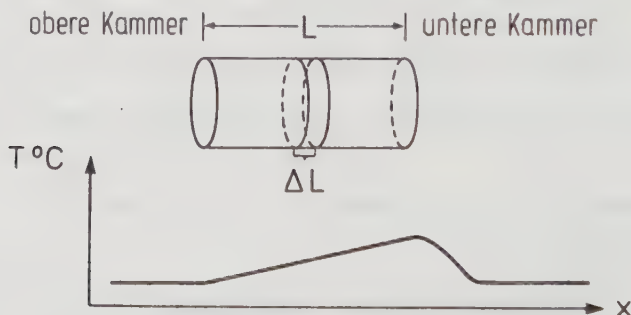


Abb. 4. Schematische Darstellung des durch den elektrischen Strom verursachten Temperaturanstieges in der Pore.

Betrachtet wird eine Flüssigkeitslamelle der Dicke Δx , die zum Durchlaufen der Länge L τ Sekunden benötigt, d.h. τ Sekunden lang aufgeheizt wird.

Alle Größen mit Δ beziehen sich auf diese Lamelle.

Damit ist: (Bergmann-Schäfer (1)):

$$\text{Widerstand: } \Delta R = \frac{\Delta x}{L} \cdot R$$

Spannungsabfall: $\Delta U = \frac{\Delta X}{L} \cdot U$

Volumen: $\Delta V = \pi r^2 \cdot \Delta X$

elektr. Energie = Wärme

$N \cdot \tau = Q = c \cdot m \cdot \Delta T$

c = spez. Wärme

m = Masse = $\rho \cdot \pi r^2 \Delta X$

ΔT = Temperaturerhöhung

$1 \text{ cal} \approx 4 \text{ Wsec}$

$\Delta N \cdot \tau = \frac{\Delta U^2}{\Delta R} \quad \tau = 4 \cdot c \cdot \rho \cdot \Delta V \cdot \Delta T$

$\Delta T = \frac{U^2 \tau}{4LR\pi r^2 \rho c}$

Mit $L = 10^{-3} \text{ cm}$

$R = 4 \cdot 10^5 \Omega$

$r = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}$

$\rho = 1 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$

$c = 1 \frac{\text{cal}}{\text{g}^\circ\text{C}}$

ergibt sich:

$\Delta T = U^2 \tau \cdot 0,3 \cdot 10^4$

mit $\tau = 10^{-2} \text{ sec}$ ("typischer" Wert)

ist für $U = 0,1 \text{ V} \quad \Delta T = 0,3^\circ\text{C}$

$U = 0,2 \text{ V} \quad \Delta T = 1,2^\circ\text{C}$

$U = 1 \text{ V} \quad \Delta T = 30^\circ\text{C}$

Für die hier durchgeführten Messungen wurde eine Meßspannung zwischen 0,1 und 0,2 V (meist 140 mV) angelegt. Damit ist die Temperaturerhöhung noch unbedeutend gering. Eine merkliche Verfälschung der Passagezeiten durch Elektrophorese zeigt sich dabei erst unterhalb eines Druckes von 0,5 cm WS = 0,04 Torr. Wegen dieser niedrigen Meßspannung muß die gesamte Kammer mit Zulaufgefäßen elektrisch abgeschirmt sein, um Störungen durch Netzbrumm usw. zu vermeiden. Deshalb ist die Kammer in einem geerdeten Blechgehäuse montiert. Die Impulse werden in einem Koaxialkabel zum Verstärker geleitet.

Von Bedeutung ist noch die Höhe des Vorwiderstandes und der Gesamtspannung. Die Spannung über dem gesamten Spannungsteiler Kammer-Vorwiderstand wird einer Trockenbatterie entnommen, um Brummspannungen am Verstärkereingang zu vermeiden. Die übrige Elektronik wird jedoch aus praktischen Gründen von einem stabili-

sierten Netzgerät gespeist.

Als gegeben sind eine Spannung über der Kammer von maximal 200 mV und die Widerstandserhöhung der Pore durch die RBZ anzusehen. Frei wählbar sind die Höhe von Vorwiderstand und Batteriespannung. Sie sollen jedoch so gewählt werden, daß die Widerstandserhöhung durch die RBZ zu möglichst hohen Impulsen führt.

Bei einem Spannungsteiler mit gegebener Vorspannung würden die Impulse am größten sein, wenn Meßwiderstand und Vorwiderstand gleich groß sind. Hier jedoch, wo die Meßspannung vorgegeben ist, muß die Batteriespannung möglichst hoch sein. Entsprechend hoch muß dann auch der Vorwiderstand sein. Das liegt daran, daß Vorwiderstand und Batterie zusammen eine sehr hochohmige Quelle bilden und damit bei Erhöhung des Meßwiderstandes der Strom nahezu konstant bleibt, der Spannungsabfall über dem Meßwiderstand somit maximal wird. Zur Erzielung der maximalen Impulshöhe genügt ein Vorwiderstand mit etwa 10-fachem Wert des Meßwiderstandes. Aus praktischen Gründen wird eine 4,5 V - Flachbatterie und ein Vorwiderstand von 10 M Ω verwendet.

Zur Beseitigung von Verstopfungen wird ein 100 pF-Kondensator auf 300 V aufgeladen und mit den Elektroden der Kammer verbunden, gleichzeitig wird der Verstärker abgetrennt.

Bei einem Kammerwiderstand von etwa 500 k Ω (verstopfte Pore!) ergibt sich mit 100 pF eine Zeitkonstante $\tau = 0,05$ msec. Bei $2 \tau = 0,1$ msec ist die Spannung auf etwa 10 % abgefallen. Durch den dabei auftretenden starken Strom wird i.a. die Pore freigespült.

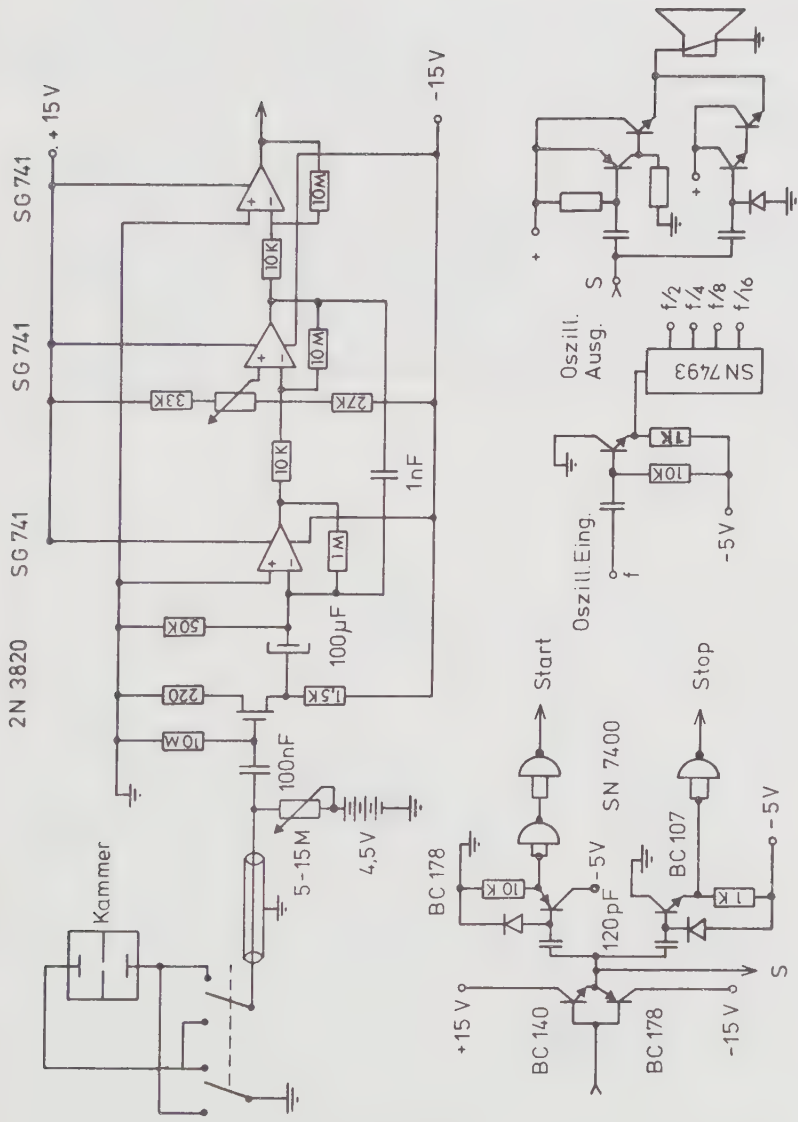


Abb. 5. Elektronik für Meßkammer, Verstärker, Signalgeber und Lautsprecher

III,3 Nachfolgeelektronik

Die Registrierung der Ereignisse erfolgt in einem Vielkanal-analysator (VKA) der Fa.Frieseke & Höpfner, Erlangen, Mod.FHT 400. Mit dem Startsignal wird der Adressenzähler im Takt eines Oszillators von Null an durchgezählt (Null entspricht dem 1. Kanal) Das Stoppsignal beendet das Weiterzählen und veranlaßt gleichzeitig, daß in den Kanal, dessen Adresse zuletzt im Adressenzähler erscheint, ein weiteres Ereignis eingezählt wird. Der VKA muß dabei auf "Laufzeit" geschaltet sein. Die Oszillatorimpulse werden einem internen Quarz-stabilisierten 20 KHz Oszillator entnommen und durch eine Untersetzerschaltung auf eine der PD angemessene Frequenz reduziert. Es können 10,5, 2,5 und 1,25 KHz entsprechend 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,8 ms/Kanal eingestellt werden.

Abb. 6 zeigt die wesentlichen Signale.

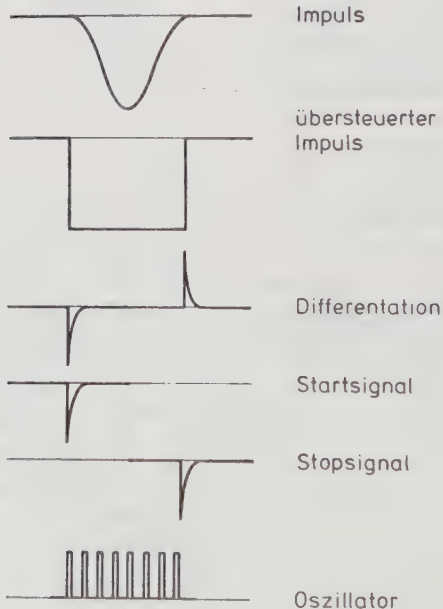


Abb. 6. Schematische Darstellung des durch RBZ-Passage ausgelösten Impulses, des übersteuerten Impulses und seiner Differentiation, aus dem sich das Start- und Stoppsignal für den Oszillator ergeben.

Das Spektrum kann im Kernspeicher des VKA beliebig lange gespeichert werden.

Die Ausgabe der Spektren erfolgt analog auf einem X-Y-Schreiber. Digitale Ausgabe könnte auf einer Schreibmaschine oder einem Lochstreifenstanzer erfolgen. Die analoge Ausgabe auf einem X-Y-Schreiber ermöglicht die sofortige graphische Auswertung z.B. die Bestimmung von Mittelwert, Maximalwert und Standardabweichung.

Zur besseren Überwachung des Experimentes wird jede Passage einer RRZ akustisch angezeigt. Die Nadelimpulse des differenzierten Rechteckimpulses werden verstärkt und erregen die Membran eines Lautsprechers der damit jeweils einen Knacklaut erzeugt. An der Qualität des Knacklautes kann man erkennen, ob die Pore durch eine Zelle verstopft wurde, was auch optisch und evtl. elektrisch zu erkennen ist, aber ständiges Beobachten erfordert.

II,4 Meßanleitung

Für die Messungen wird die Kammer im Abschirmgehäuse montiert. Gegebenenfalls wird ein neues Porenfilter eingeklebt. Dann werden die Vorratsgefäße angeschlossen und die Zufuhrkanüle für die Ervthrozvten-Suspension justiert. Jetzt wird das Gehäuse am Mikroskop befestigt und justiert, sodaß die Pore etwa ins Zentrum des Blickfeldes gelangt. Nach Anschließen des Koaxialkabels liest man am Oszilloskop eine Gleichspannung ab, die durch den Vorwiderstand und den Eingangswiderstand des Oszilloskops ($1\text{ M}\Omega$) gegeben ist, da der Kammerwiderstand noch $\rightarrow \infty$ ist. Das Oszilloskop ist hierbei am Mittelpunkt des Spannungsteilers angeschlossen. Nach Einfüllen der Flüssigkeit springt der Gleichspannungspegel auf einen Wert der jetzt dem Verhältnis vom Vorwiderstand und Kammerwiderstand ($350\text{ K}\Omega$) entspricht. An der Höhe des Pegels ist zu erkennen, ob ein Fehler vorliegt oder nicht. Ist die Pore verstopft oder noch durch Luftblasen abgeschirmt, so ist der Pegel zu hoch,

bei einem Leck ist er zu niedrig. Wenn keine Fehler aufgetreten sind, wird die Erythrozytensuspension in das Vorratsgefäß gegeben. Dann kann die Messung beginnen. Wenn sich die Pore verlegt, was akustisch, optisch und elektrisch zu erkennen ist, genügt es i. a. durch Erzeugung von Über- und Unterdruck kräftig zu spülen, um die Pore wieder freizubekommen. Nach Abschluß der Messungen müssen Kammer und Zulaufgefäße gut gespült werden, um sie vor Rückständen zu reinigen und damit Kriechströme über etwa verunreinigte Oberflächen vermieden werden.

Bereitung der Erythrozytensuspension

Für die Gewinnung der RBZ werden ca. 5 ml Venenblut entnommen. Als Antikoagulantium dient stets EDTA (1,5 mg/ml). Das Blut wird sofort etwa 5 Minuten bei 1 000 - 3 000 g zentrifugiert. Der überstehende weiße Belag (sog. buffycoat) kann dann abgesaugt werden. Damit werden vor allem die Thrombozyten entfernt und damit Mikrothromben in der Meßkammer vermieden. Bis die Zellsuspension kurz vor der Messung angesetzt wird, verbleiben die Zellen im Kühlschrank bei ca. 4 - 6 °C.

a) Suspension im Serum

Für Messungen mit RBZ im eigenen Serum werden bei der Größe der Meßkammer etwa 70 - 100 ml Serum benötigt. Entsprechend müssen 150 - 200 ml Vollblut ohne Antikoagulantium entnommen werden. Das Vollblut wird durch ca. 10 min. Rühren defibriniert. Das ist zweckmäßiger als das Fibrin bei antikoaguliertem Blut wieder auszufällen. Anschließend werden die Blutzellen abzentrifugiert (3 000 g, 10 Minuten) und das überstehende Serum abgehoben. Das abgehobene Serum wird noch einmal mit Millipore-Filtern o.ä. filtriert. Dann kann die Zellsuspension hergestellt werden. Die Konzentration ist nicht sehr kritisch. Auf 5 ml Serum werden etwa 0,1 ml gepackte RBZ gegeben (Hct 2 %).

b) Suspension in Parpart'scher Lösung

Parpart'sche Lösung stellt im wesentlichen eine physiologische

Kochsalzlösung dar, jedoch mit Phosphat gepuffert.[⊕]

Diese Lösung wird zweimal mit Millipore-Filtern (1,2 μ) gefiltert und mit 2,5 g/l Human-Albumin versehen. Das Albumin ist nötig, damit die RBZ nicht stechäpfelig werden. Die Zellsuspension wird wie oben hergestellt.

Zu IV,2 In Ermangelung einer Regelung wurde die Temperatur eingestellt, indem die gefüllte Kammer im Abschirmgehäuse montiert im Kühlschrank auf 6°C abgekühlt wurde. Während der Zeit des Aufwärmens bis auf Raumtemperatur wurden die Messungen durchgeführt und die jeweilige Temperatur gemessen. Im Verlauf einer Messung änderte sich dabei die Temperatur um etwa 1°C. Für höhere Temperaturen wurde die Kammer durch ein Warmluftgebläse erwärmt.

Zu IV,3 Der pH-Wert der Zellsuspension wurde durch Dialyse in einem Cellulose-Schlauch eingestellt. Als Dialysierflüssigkeit diente Parpart'sche Lösung, die mit Lactat auf einen pH von etwa 4,0 gebracht worden war. Der pH-Wert der Kammerflüssigkeit wurde direkt durch Zugabe von Lactat eingestellt.

Zu IV,4 Abzentrifugierte RBZ mit einem geringen Überstand an Plasma wurden unter Luftabschluß bei 37 °C inkubiert. Nach jeweils 0,6 und 24 Stunden wurden die Messungen durchgeführt und der ATP-Gehalt (gemessen nach: 1. Hexokinasereaktion 2. 3-Phosphoglyceratkinasereaktion) bestimmt. Nach 24 Stunden wurde Adenosin und Glucose im Überschuß zugegeben und 2 Stunden später gemessen.

Zu IV,5 Vollblut wurde wie üblich zentrifugiert, die abzentrifugierten RBZ in 0,25 %ige Albumin-Parpart-Lösung gegeben (etwa 2 ml Zellen auf 8 ml Lösung), gut durchgemischt und wieder abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dieser Vorgang wur-

[⊕] NaCl	143 mMol/l	
Na ₂ HPO ₄	11,5 mMol/l	285 mOsmol/l
NaH ₂ PO ₄	6,4 mMol/l	

de noch einmal wiederholt, sodaß die RPZ zweimal gewaschen wurden. Darauf wurde mit den gewaschenen Zellen die Suspension wie üblich hergestellt. Die normale Zellsuspension (mit ungewaschenen Zellen) wurde mit 0,25 % Albuminlösung wie oben beschrieben hergestellt.

Zu IV,7 RBZ wurden mit verschiedenen Enzymen:

Papain, Neuraminidase, Chymotrypsin, Trypsin, Pronase, Hyaluronidase, Lysozym, Elastase inkubiert. Damit sollte in unterschiedlicher Weise die Ladung der RPZ reduziert werden. Anschließend wurden die RBZ sorgfältig 3 mal gewaschen. Ansonsten wurde die Zellsuspension mit 0,25 % Albuminlösung wie oben beschrieben hergestellt.

Zu IV,8 Die Osmolarität der Albuminlösung wurde durch Hinzufügen von destilliertem Wasser bzw. hypersalinem Wasser (jeweils mit 0,25 % Albumin) eingestellt.

Zu IV,9 Die Größe der Meßspannung wurde durch Veränderung des Vorwiderstandes bei konstanter Batteriespannung eingestellt.

IV. Messungen und Auswertung

Die gemessenen Passagedauern wurden von einem Vielkanal-analysator gespeichert und jeweils analog über einen X-Y-Schreiber ausgegeben. Abb. 7 zeigt Spektren unter verschiedenen Bedingungen.

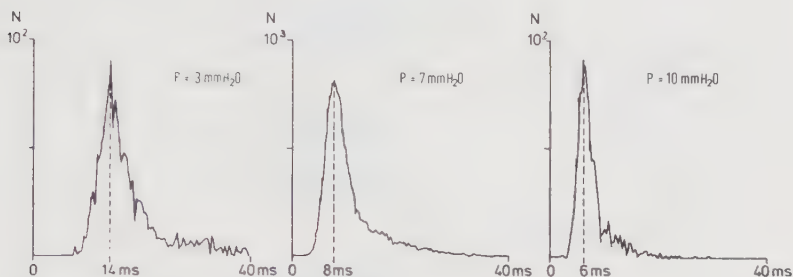


Abb. 7. Histogramme der RBZ-Passagedauer bei einem treibenden Druck von 3, 7 und 10 mm H₂O.

Für die Auswertung wird aus praktischen Gründen der häufigste Wert ermittelt. Er ist immer etwas kleiner als der Mittelwert, der Grund wird in Kap. V näher erläutert. Zur Erfassung des Anteiles an rigiden oder schwerpassierbaren Zellen wird die Summe im letzten Kanal bestimmt. Dieser Wert ist abhängig von der Gesamtzahl der registrierten RBZ. Deshalb wird er normiert durch die Quotientenbildung $RF = \frac{\text{Summe des letzten Kanals}}{\text{Summe im Peak (= häufigster Wert)}}$

Die normierten Werte verschiedener Spektren können dann miteinander verglichen werden, wenn sie die gleiche Zeitskala haben. Im folgenden wird häufiger eine Übereinstimmung mit früheren Messungen (9 , 10 , 11) festgestellt. Dabei wurden PD mit Viskosität und Perfusionsdruck P mit Schergrad als korrespondierend betrachtet. Es ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Viskosität entscheidend von der Aggregation abhängt, die bei den Messungen dieser Arbeit keine Rolle spielt.

1. Druck-Zeit-Abhängigkeit

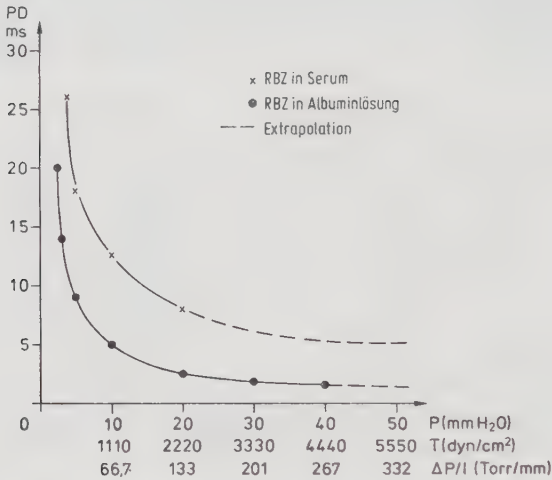


Abb. 8. Abhängigkeit der Passagezeit von RBZ in Serum und isotonischer Albuminlösung als Funktion des treibenden Druckes, der Wandschubspannung und des Druckgradienten.

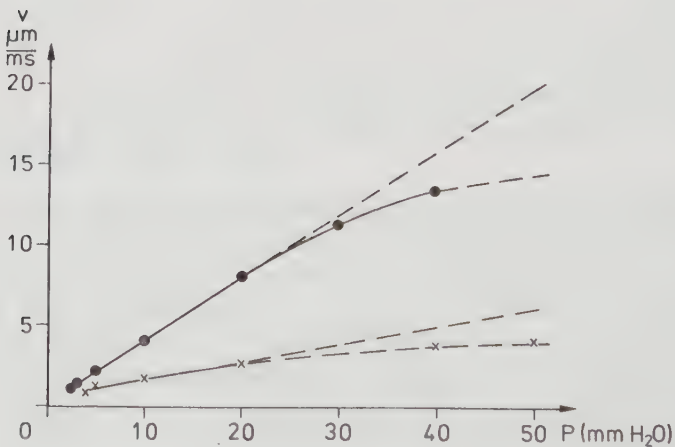


Abb. 9. Abhängigkeit der mittleren Erythrozytengeschwindigkeit vom Druck über der Pore (gleiche Symbole wie in Abb. 8.)

Die Messung der PD in Abhängigkeit vom Perfusionsdruck wurde in Serum und 0,25 % Albuminlösung bei Raumtemperatur durchgeführt. Aus der PD läßt sich die Passagegeschwindigkeit errechnen.

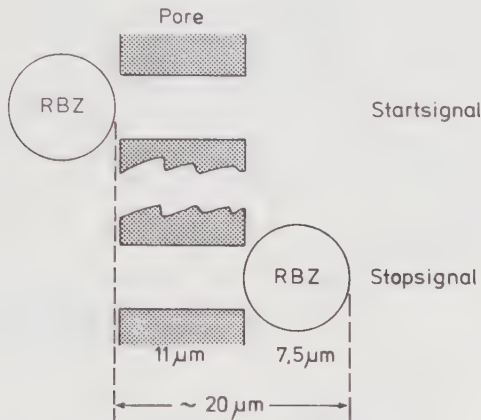


Abb. 10. Schematische Darstellung der Passage einer RBZ durch die Pore mit Abschätzung der Meßstrecke während des übersteuerten elektronischen Signales.

Vermutlich beginnt der Impuls bereits kurz bevor der Erythrozyt die Pore erreicht. Da er erst endet, wenn der Erythrozyt die Pore bereits verlassen hat, ergibt sich eine Meßstrecke von ca 20 µm und daraus eine Geschwindigkeit von

$$\frac{20 \mu\text{m}}{1,5 \text{ msec}} \approx 13 \frac{\mu\text{m}}{\text{msec}} \text{ in Albuminlösung und } \frac{20}{5} = 4 \frac{\mu\text{m}}{\text{msec}} \text{ im Serum}$$

bei jeweils $P = 50 \text{ mm H}_2\text{O}$ und 20°C . Aus früheren Messungen mit Nuclepore-Filtern läßt sich aus der Flußrate von reinem Plasma bzw. einer 10 %igen Zellsuspension ebenfalls eine Passagegeschwindigkeit von $4,1 \mu\text{m/msec}$ berechnen bei $50 \text{ mm H}_2\text{O}$ und 20°C (9). Das ist eine sehr gute Übereinstimmung mit dem oben genannten Wert von RBZ im Serum.

Aus Abb. 9 ist zu ersehen, daß die Geschwindigkeit weitgehend

(vor allem im physiologischen Bereich) proportional dem Druck ist, bei höheren Drucken steigt sie jedoch unterproportional. Das kann auf eine größere Streckung der RBZ zurückzuführen sein und/oder darauf, daß die Zelle eine bestimmte Zeit benötigt, um sich zu verformen.

Die P entsprechende Wandschubspannung $\tau_w = \frac{\Delta P r}{2 l}$ (dyn/cm²) bzw. der Druckgradient $\frac{\Delta P}{l}$ (Torr/mm) ist ebenfalls in Abb. 11 eingezeichnet und kann auf alle weiteren Figuren übertragen werden. Die Messungen in Serum bzw. Albuminlösung wurden in verschiedenen Meßreihen an verschiedenen Poren durchgeführt. Deshalb sind die Absolutwerte nicht unbedingt exakt miteinander vergleichbar.

2. Temperatur-Zeit-Abhängigkeit

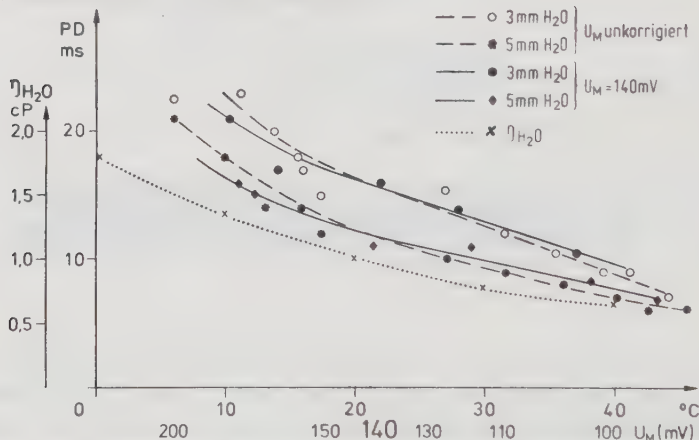


Abb. 11. Abhängigkeit der mittleren Passagedauer von der Temperatur bei verschiedenen Drucken. Die gepunktete Linie zeigt zum Vergleich die Temperaturabhängigkeit der Viskosität des Wassers. Auf der Abszisse ist außerdem die Meßspannung eingetragen, die bei konstantem Vorwiderstand ebenfalls eine Funktion der Temperatur ist.

Die Messungen wurden mit Albuminlösung durchgeführt. Es ergibt sich ein kontinuierlicher Abfall der Passagedauer mit steigender Temperatur der unter 15 °C stärker ausgeprägt ist. Zum Vergleich ist die Viskosität der reinen Albuminlösung aufgezeichnet. In Abb. 11 laufen PD und η weitgehend parallel, bei niedrigen Temperaturen steigt PD jedoch stärker an. Diese

Ergebnisse entsprechend den Messungen aus (9), wo bei 4 °C sowohl die scheinbare als auch die relative Viskosität wesentlich höher liegen als bei 20 und 37 °C.

Wegen der Temperaturabhängigkeit der elektrischen Leitfähigkeit der Lösung verringert sich bei zunehmender Temperatur und konstantem Vorwiderstand die Meßspannung. Sie ist in Abb. 11 unter der Temperaturskala mit aufgetragen (Vorwiderstand 10 M Ω). Damit werden die Impulse kleiner und die Passagezeiten verhältnismäßig kürzer gegenüber denen bei tiefen Temperaturen registriert. Das täuscht insgesamt eine zu große Temperaturabhängigkeit vor. Mit einem variablen Vorwiderstand wurde die Meßspannung konstant auf 140 mV gehalten.

3. pH-Zeit-Abhängigkeit

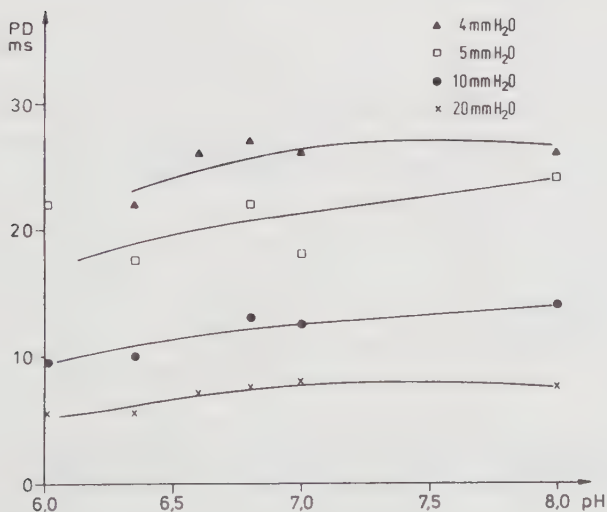


Abb. 12. Abhängigkeit der Passagedauer von RBZ in isotoner Albuminlösung vom pH-Wert bei verschiedenen treibenden Drücken.

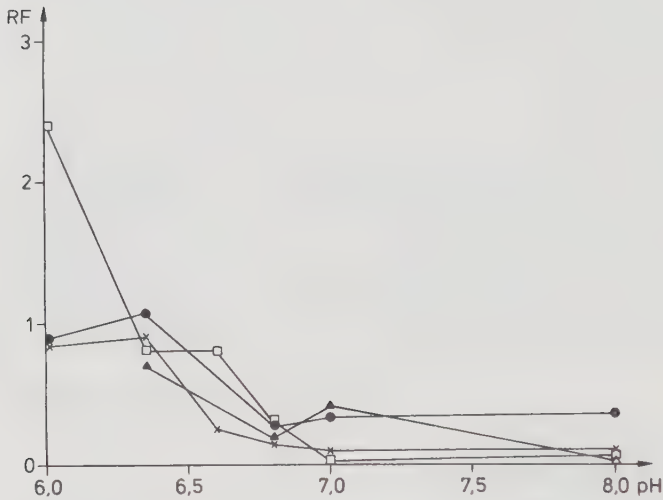


Abb. 13. Abhängigkeit der Zahl schwerpassierbarer RBZ (RF-Quotient s. S.19) vom pH-Wert der isotonen Albuminlösung. Symbole wie in Abb. 12.

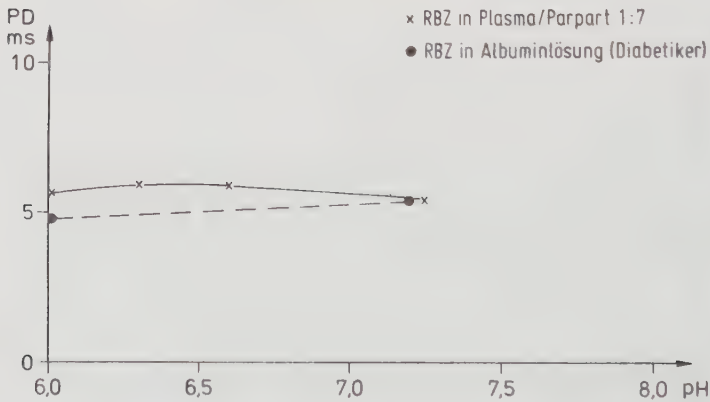


Abb. 14. Abhängigkeit der Passagedauer von RBZ in verdünntem Plasma bzw. in Albuminlösung.
 x = RBZ von Normalpersonen in verdünntem Plasma
 ● = RBZ von einem Diabetiker in isotoner Albuminlösung

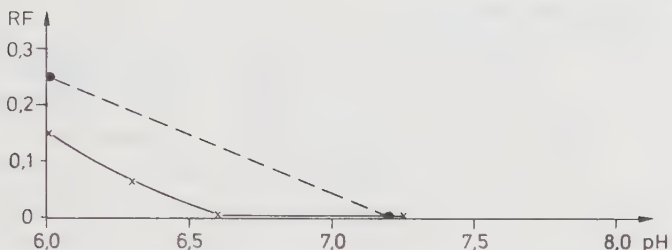


Abb. 15. Abhängigkeit der Zahl schwerpassierbarer RBZ (RF-Quotient s. S.19 vom pH-Wert der Lösung. (Symbole wie Abb. 14).

Die Messungen sowohl in Serum, mit Parp. 1 : 7 verdünntem Plasma wie auch in Albuminlösung zeigen, daß die meisten RBZ bei pH-Erniedrigung nicht rigider werden, jedoch läßt der drastische Anstieg des Rigiditätsfaktors erkennen, daß der (immer noch relativ geringe) Anteil rigider Zellen beträchtlich ansteigt. So kommt bei niedrigerem pH auf etwa 10 - 100 Zellen eine "rigide". Außerdem war festzustellen, daß bei Verwendung von Plasma sich beim Ansäuern sehr starke Praecipitate bildeten, die die Pore häufig verstopften. Damit kann erklärt werden, daß mit der Filtrationsmethode durch Porensiebe, wo im Mittel z.B. 10^4 Zellen eine Pore passieren müssen, durch frühzeitiges Verstopfen keine Filtration mehr möglich ist und damit fälschlicherweise auf eine Rigidifizierung der gesamten Zellpopulation geschlossen wurde(10).

Die Vermutung (und Befürchtung), daß sich die RBZ so verhalten könnten, stellte ein wesentliches Motiv für die Durchführung

Die Messungen von Abb. 14 und 20 wurden mit einem Vorläufer der beschriebenen Meßschaltung bei ca 1 V Meßspannung gegen die Feldrichtung gemessen. Deshalb sind die Absolutwerte der PD höher als bei den übrigen Messungen.

dieser Arbeit dar.

4. ATP-Gehalt-Zeit-Abhängigkeit

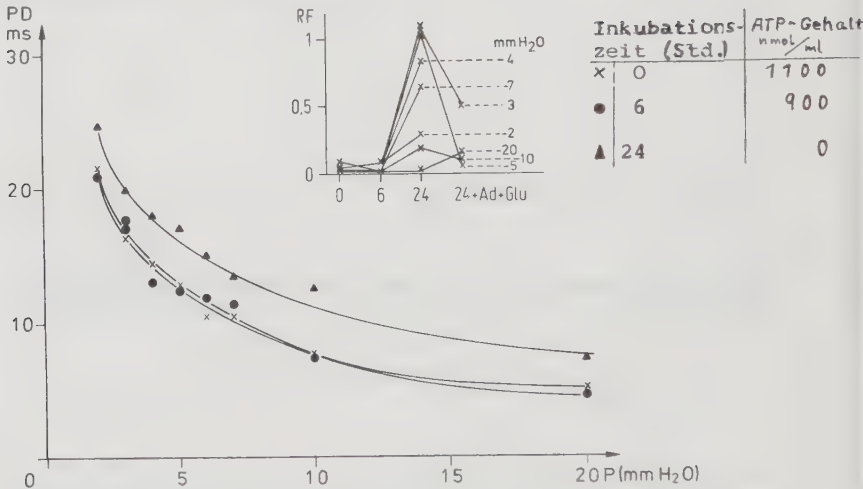


Abb. 16. Abhängigkeit der mittleren Passagedauer vom Gehalt der RBZ an Adenosintriphosphat bei verschiedenen treibenden Drucken. Als Einschub ist die Zahl schwerpassierbarer RBZ gezeichnet.

Seit den Messungen von Weed und Lacelle (15) wird angenommen, daß die Verformbarkeit der Erythrozyten, die von diesen Autoren mit der Mikropipettentechnik gemessen wurde, stark vom Gehalt der Erythrozyten an ATP abhängt. Die Untersuchungen von Schrader (12) ließen jedoch vermuten, daß die Befunde von Weed und Lacelle stark von einem Kalziumphosphat-Präzipitat auf der Membranoberfläche abhängen und außerdem ist anzunehmen, daß bei der Mikropipettentechnik in sehr starkem Maße der Grad der Sphärizität der RBZ mitbestimmend wirkt. Auch bei unseren Messungen zeigte sich nach einem Verlust der RBZ an ATP, wie er durch Inkubation bei 37°C erreicht wurde, eine zwar signifikante aber relativ geringe Erhöhung der PD. Dagegen ist die Zahl der schwerpassierbaren Zellen (RF-Faktor) sehr stark angestiegen. Nach Zugabe von Adenosin und Glukose zu den präinkubierten RBZ normalisiert sich

sowohl die mittlere Passagedauer als auch die Zahl schwerpassierbarer RBZ.

Beide Befunde unterstützen zwar die Theorie, daß bei ATP-Verlust eine dünne Schicht von Kalziumphosphat-Niederschlag an der Membran die Zellen etwas rigider macht, Ausmaß und Mechanismus der dadurch ausgelösten Rigidifizierung muß jedoch nach den vorliegenden Befunden neu untersucht werden. Hier muß insbesondere der Einfluß von freiem Kalzium sowie der Einfluß der normalen Plasmaproteine nachgeprüft werden. Unsere bisherigen Befunde lassen jedoch vermuten, daß die Fluidität der Gesamtpopulation von Erythrozyten nicht so stark beeinträchtigt ist, wie dies die Mikropipetten-Versuche von Weed und Lacelle vermuten ließen.

Analoge Ergebnisse fanden wir bei RBZ, die während 60 Stunden im eigenen Plasma bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden. Auch hier zeigte sich nur eine geringfügige Zunahme der mittleren Passagedauer, jedoch eine drastische Zunahme der Zahl schwerpassierbarer Zellen, besonders bei niedrigen treibenden Drucken (nicht abgebildet).

5. Gewaschene und ungewaschene RBZ

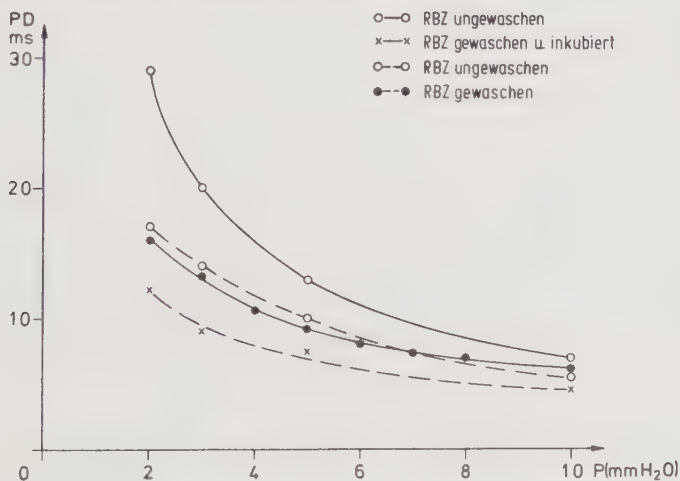


Abb. 17. Abhängigkeit der Passagedauer von RBZ von der Waschung in isotoner Albuminlösung.

Gemessen wurde in Albuminlösung. Die durchgezogenen und unterbrochenen Kurven stammen von verschiedenen Meßreihen. Die ungewaschenen Zellen brauchen deutlich länger. Dieser Effekt ist möglicherweise auf die an der Membran anhaftenden Proteine oder auf einen Ca_3PO_4 -Niederschlag, die beim Waschen entfernt werden, zurückzuführen. Messungen mit gepackten Zellen (Hct 95 %) ergaben das gleiche Verhalten (9). Der Effekt ist auch hier bei niedrigeren Drucken bzw. Schergraden stärker ausgeprägt.

6. Alter des Spenders

Neugeborene Kinder haben im Mittel größere Zellen und einen höheren Hämatocrit (13). Da jedoch in der Regel keine Störungen in der Mikrozirkulation bei gesunden Kindern auftreten, konnte man erwarten, daß die RBZ fluider sind. Tatsächlich zeigte sich jedoch, daß die Passagedauer der Zellen eines 3 Tage alten Kindes durchwegs am höchsten war, wenngleich sie nur geringfügig über der Norm lag. Möglicherweise wird eine größere Passagedauer durch das größere Zellvolumen vorgetauscht (siehe Abschnitt V). Man kann deshalb annehmen, daß die Fluidität der RBZ bei gesunden Erwachsenen und bei gesunden neugeborenen Kindern etwa gleich ist.

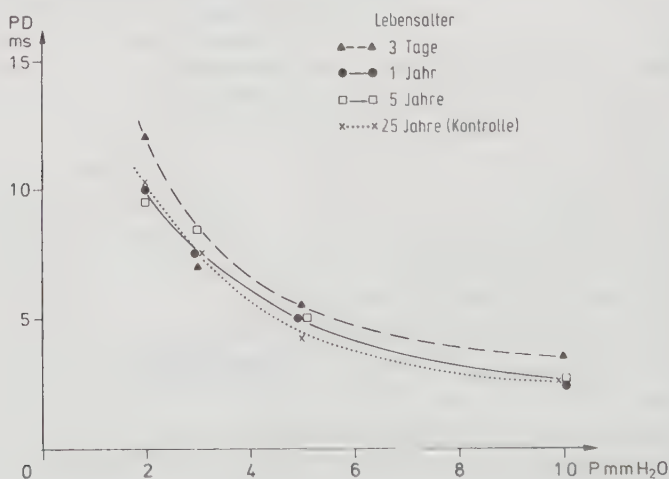


Abb. 18. Abhängigkeit der Passagedauer von RBZ vom Lebensalter des Spenders.

7. Enzymatisch veränderte RBZ

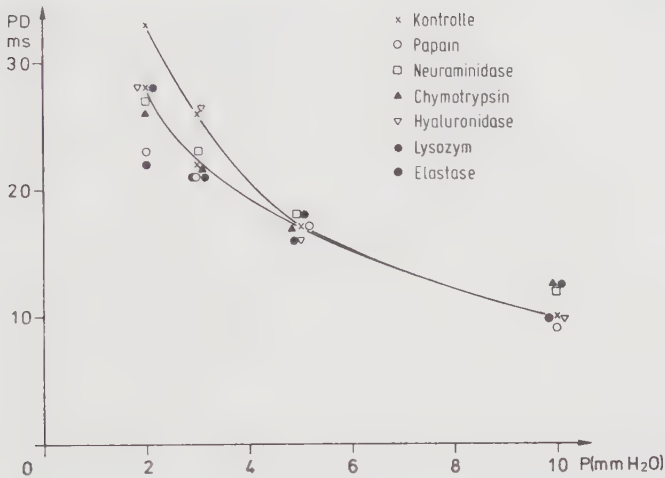


Abb. 19. Abhängigkeit der Passagezeit von RBZ von der Vorbehandlung mit verschiedenen proteolytischen Enzymen.

Im Rahmen der Untersuchung eines möglichen Zusammenhanges zwischen Ladung und Aggregationsneigung von Erythrozyten (Schachtner und Schmid-Schönbein, unveröffentlicht) wurden RBZ mit verschiedenen Enzymen inkubiert, um die Oberflächenladung zu reduzieren. Dabei wurde die elektrophoretische Beweglichkeit von $1,08 \frac{\mu\text{m} \cdot \text{cm}}{\text{sec} \cdot \text{V}}$ unterschiedlich stark reduziert. Den stärksten Effekt zeigte Neuraminidase ($0,25 \frac{\mu\text{m} \cdot \text{cm}}{\text{sec} \cdot \text{V}}$), den geringsten Effekt Chymotrypsin ($0,85 \frac{\mu\text{m} \cdot \text{cm}}{\text{sec} \cdot \text{V}}$). Jedoch zeigte diese Tatsache keine signifikanten Änderungen der PD gegenüber der Kontrolle. Bei Messungen mit und gegen die Feldrichtung hat sich bei den Kontrollen erst bei Drucken unterhalb von 5 mm H₂O eine signifikante Verzögerung (obere Kurve, gemessen entgegen der Feldrichtung) ergeben.

8. Osmolarität

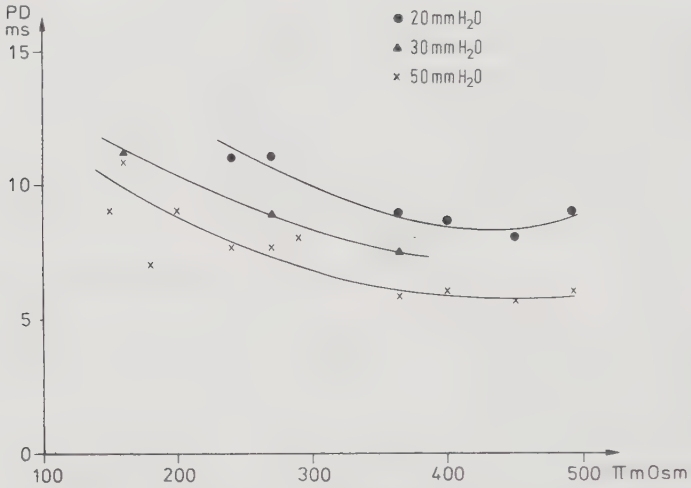


Abb. 20. Abhängigkeit der Passagezeit von RBZ von der Osmolarität der suspendierenden Albuminlösung. Messungen bei hohen Drucken (s. a. Fußnote S.25)

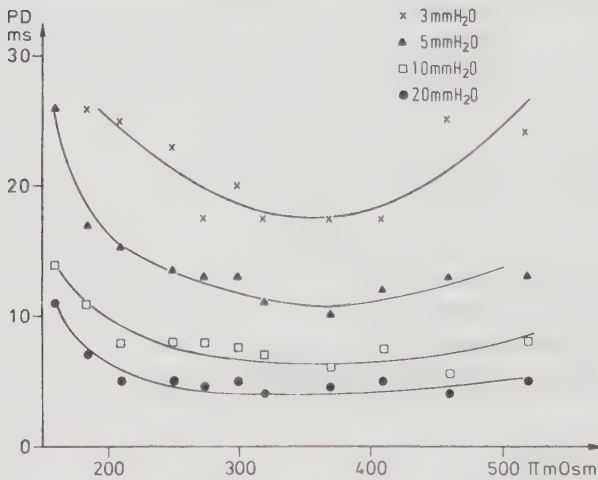


Abb. 21. Abhängigkeit der Passagedauer von RBZ von der Osmolarität bei niederen treibenden Drucken.

Die Messungen wurden mit Albuminlösung durchgeführt. Bei niedrigem osmotischen Druck (geschwollene Zellen) steigt erwartungsgemäß die PD an, umso mehr, je niedriger der Perfusionsdruck ist. Bei hohem osmotischem Druck (stech-äpfelige, geschrumpfte Zellen) und niedrigem Perfusionsdruck steigt die Passagedauer ebenfalls stark an, bei hohem Perfusionsdruck dagegen nicht. Dieses Ergebnis ist konform mit früheren Messungen (11). Hier ergaben normale RBZ generell die niedrigste relative Viskosität, osmotisch geschwollene RBZ (150 mOsm) bei niedrigen Schergraden eine mäßig erhöhte relative Viskosität, die bei hohen Schergraden erhöht blieb. Bei osmotisch geschrumpften RBZ war die relative Viskosität bei niedrigen Schergraden stark erhöht, bei hohen Schergraden lag sie jedoch unter derjenigen von geschwollenen Zellen. Die Messungen wurden ohne Korrektur der Meßspannung durchgeführt. Bei einer Korrektur würde sich eine Absenkung der Werte bei niedrigerer Osmolarität und ein Anheben bei höherer Osmolarität um etwa 10 % am Skalenende ergeben.

9. Spannungsabhängigkeit

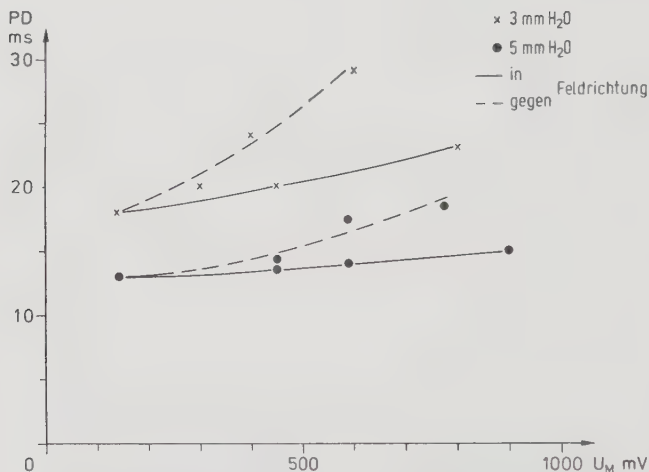


Abb. 22. Abhängigkeit der Passagedauer von RBZ von der angelegten Meßspannung (U_M). Der Kurvenverlauf zeigt, daß bei den benutzten Meßspannungen (i.a. 140 mV) die Aufspaltung der PD-Werte bei Messungen mit und gegen die Feldrichtung so gering ist, daß keine wesentliche Verfälschung der wahren PD auftritt.

Wie in III,2 erläutert, beeinflusst die Meßspannung die gemessene PD. Eine Erhöhung der Meßspannung ergibt:

1. eine längere Zeit wegen der größeren Impulse und der vergrößerten "elektrischen Länge" der Pore;
2. wächst die Größe der Zeitdifferenz zwischen Messungen mit und gegen die Feldrichtung.

V. Ausblick

Mit der beschriebenen Methode wird die Präzision der Messungen (z.B. gegenüber Porensieben) verbessert

1. weil Verstopfungen durch rigide Zellen oder sonstige Bestandteile erkannt und beseitigt werden können.
2. Die genauen Abmessungen der Pore (z.B. mit Raster-Elektronen-Mikroskop) bestimmt werden können.

An den Spektren fällt stets eine Rechtsschiefe auf. Das bedeutet, daß der Mittelwert immer größer als der häufigste Wert ist. Diese Unsymmetrie hat folgende Gründe:

1. Zwei unmittelbar aufeinander folgende RBZ ergeben möglicherweise einen sattelförmigen Impuls, der dann nur als ein längeres Ereignis registriert wird.

Große RBZ dürften bei gleicher spezifischer Verformbarkeit ein überproportional längeres Signal verursachen :

2. weil sie sich stärker verformen müssen; für sie ist das Loch relativ kleiner, sie brauchen also länger;
3. weil die Impulse größer sind und damit der Anstieg schneller erfolgt;
4. weil die Impulse früher beginnen, d.h. die elektrisch gesehene Porenlänge größer ist.

Die Punkte 3. und 4. bedeuten, daß die Triggerschwelle der Elektronik schneller erreicht und später wieder unterschritten wird.

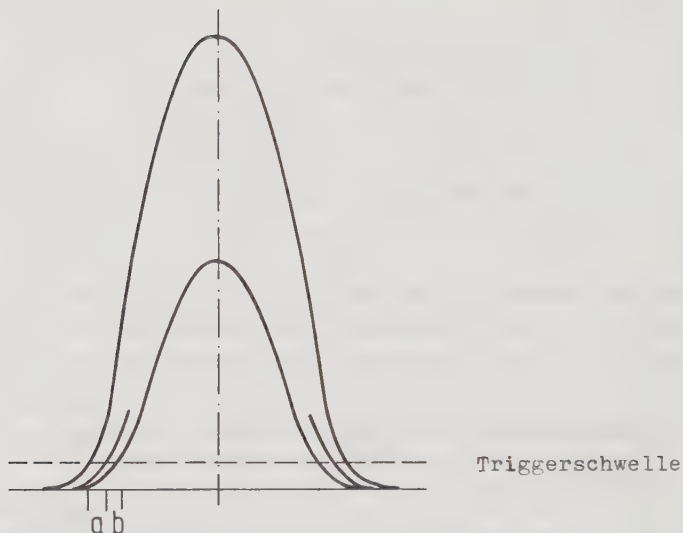


Abb. 23. Schematische Darstellung des möglichen Meßfehlers auf Grund unterschiedlicher Zellgrößen (s. Text).

Der Zeitunterschied b ist auf die Gründe von Punkt 3., a auf Punkt 4. zurückzuführen. Die Zeit $2(a + b)$ ist der Meßfehler, der bei zwei verschiedenen großen RBZ auftritt.

Wie aus Abb. 23 ersichtlich, fällt Punkt 3. umso weniger ins Gewicht, je mehr übersteuert wird, d.h. je größer die Verstärkung ist. In dieser Schaltung wurde die Verstärkung so groß gewählt, daß der Fehler von Punkt 3. kleiner ist als das Auflösungsvermögen bei der Registrierung.

Punkt 4. bleibt dadurch jedoch unberührt. Bei Verdoppelung der Impulshöhe ergibt sich dadurch etwa eine Verlängerung um 10 %.

Wenn die Messung nicht elektrisch sondern optisch erfolgt, werden von vornherein die Fehler von Punkt 3. und 4. vermieden. Ebenso entfällt naturgemäß eine Korrektur bei Veränderungen der Leitfähigkeit der Flüssigkeit.

Außerdem kann die Verbindung zwischen oberem und unterem Kammerteil durch mehrere Poren hergestellt werden, damit ist durch die Möglichkeit von simultanen Messungen eine Verkürzung der Meßzeit zu erreichen.

Mit der optischen Methode wurden bereits mehrere Versuche durchgeführt zusammen mit der Fa. Leitz. Erfolgsversprechend waren Versuche mit einer Interferenz-Kontrast-Optik und nachgeschaltetem Photomultiplier. Jedoch müssen bzgl. der Signalgewinnung noch Verbesserungen gemacht werden.

Bei der beschriebenen Apparatur sind ebenfalls noch wesentliche Verbesserungen möglich.:

1. Die Pore sollte stabiler sein, z.B. durch eine Glaskapillare gebildet. Damit könnten starke Verstopfungen durch Kondensator-entladungen besser beseitigt werden, ohne die Pore zu zerstören. Bisher würde ein kräftiger ~~er~~ Stromstoß (z.B. größere Kapazität) zwar größere Verstopfungen beseitigen können, aber wegen der auftretenden Erhitzung zur Zerstörung der Pore führen. Für weitere Messungen müßte dann eine neue Pore eingesetzt werden, die evtl. einen anderen Durchmesser hat, so daß die Meßergebnisse nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden können.

2. Besonders für Messungen im Serum oder Plasma wäre es wichtig, das Volumen von Kammer und Reservoir kleiner zu machen, da sonst relativ viel Vollblut (z. Zt. ca 150 ml) benötigt wird.

3. Zur Verwirklichung von 2. aber auch wegen der Präzision der Messungen ist eine Verbesserung der Druckdifferenzanzeige evtl. mit automatischer Regulierung nötig. Die Benutzung von Schwimmern benötigt ein relativ großes Reservoirgefäß und ist bei niedrigen Drücken ziemlich ungenau.

Ein einfaches Manometer mit Schläuchen, die aus der Abschirmung herausgeleitet sind, hat sich nicht bewährt. Eine Möglichkeit wäre der Einsatz von Dehnungsmeßstreifen mit Anzeigeinstrument (analog oder digital). Die Elektronik könnte dabei gleich zur automatischen Konstanthaltung z.B. über ein Kolbensystem be-

nutzt werden. Die automatische Konstanthaltung ist besonders bei geringen Drucken (und langen Meßzeiten) wichtig, weil das einfließende Meßgut das Niveau der oberen Kammer und damit die Druckdifferenz erhöht.

4. Wegen der Temperaturabhängigkeit der PD ist eine Temperaturregulierung wichtig. Sie könnte z.B. durch Umspülen der Kammer mit einer thermostatisch geregelten Flüssigkeit oder mit einem in der Kammer befindlichen Peltierelement erfolgen.

5. Die Zuführungskanüle für die Erythrozytensuspension sollte justierbar sein. Z.B. könnte sie unter optischer Kontrolle mit Mikromanipulatoren in eine Position gebracht werden, so daß die Erythrozyten direkt auf die Pore zuströmen. Damit kann die Kanüle sehr dünn gehalten werden und wesentlich weniger RBZ würden in die obere Kammer gelangen, die Flüssigkeit bleibt klar und trotzdem kommen die RBZ in genügend kurzen Abständen in die Pore (wichtig für kurze Meßzeiten).

6. Eine Verbesserung der Genauigkeit des bisher nur halbquantitativen Rigiditätsfaktors läßt sich erreichen durch:

- a. größere Zeitachse, d.h. die völlig rigiden Zellen werden besser von denen getrennt, die zwar noch passierfähig sind, aber länger als die dem letzten Kanal entsprechende Zeit brauchen;
- b. mit einem Zähler wird registriert, wie oft die Kondensator-Entladung betätigt wurde;
- c. eine Integralbildung des gesamten Spektrums ergibt durch die Quotientenbildung $\frac{\text{Zahl im letzten Kanal}}{\text{Integral}}$ eine exaktere Normierung. Die Integralbildung kann im VKA erfolgen oder durch einen externen Zähler, der bei jedem Impuls angesteuert wird.

Literatur:

- (1) Bergmann, L. und Schäfer, C.: Lehrbuch der Experimentalphysik.
Bd.2 S.133, Walter de Gruyter, Berlin (1961)
- (2) Braasch, D.: Deformability and traversing time of shape transformed singel red cells passing through a 5 μ m glass capillary.
Pflüger's Archiv 329, 161-171 (1971)
- (3) Budó, A.: Theoretische Mechanik.
S. 516-518, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1963)
- (4) Ditzel, J.: Whole blood viscosity and related components in diabetes mellitus.
Danish med. Bull. 15, 49-53 (1968)
- (5) Fung, Y. C.: Theoretical considerations of the elasticity of red cells and small blood vessels.
Fed. Proc. 25, 1761-1772 (1966)
- (6) Mehrishi, J. N.: Molecular aspects of the mammalian cell surface.
Progress in Biophysics and Molecular Biology Vol.25, 2 Oxford/N.Y. (1972)
- (7) Schachtner, H. und Schmid-Schönbein, H.: unveröffentlichte Mitteilung.
- (8) Schmid-Schönbein, H., Wells, R. E. und Goldstone, J.:
Fluid drop-like behaviour of erythrocytes-disturbance in pathology and its quantification.
Biorheology 7, 227-234 (1971)
- (9) Schmid-Schönbein, H., Klose, H., Volger, E. und Weiss, J.:
Hypothermia and blood flow behaviour
Res. exp. Med. 161, 58-68 (1973)
- (10) Schmid-Schönbein, H., Weiss, J. und Ludwig, H.:
A simple method for measuring red cell deformability in models of the microcirculation.
Blut 26, 369-379 (1973)

- (11) Schmid-Schönebein, H., Goldstone, J. und Wells, R. E.:
Model experiments in red cell rheology: the
mammalian erythrocyte as a fluid drop.
Theoretical and Clinical Hemorheology, H.H. Har-
tert and A.L. Copley, Eds., Heidelberg/New York
(Springer) (1971) S. 233-241
- (12) Schrader, J.: Is the human erythrocyte membrane per-
meable to calcium.
Erythrocytes, Thrombocytes, Leukocytes, S. 43-45
Georg Thieme Publishers, Stuttgart (1973)
- (13) Spector, W. S.: Handbook of Biological Data
S. 275 (1956)
- (14) Volger, E. und Schmid-Schönbein, H.: Mikrorheologisches
Verhalten des Blutes beim Diabetes mellitus.
Med. Welt 25, 1211-1213 (1974)
- (15) Weed, R. J. und Lacelle, P. L.: ATP dependence of ery-
throcyte membrane deformability.
Red Cell Membrane, S. 318-338
- (16) Wells, R. E. und Schmid-Schönbein, H.: Red cell defor-
mation and fluidity of concentrated red cell
suspensions.
J. Appl. Physiol., 27, 213-217 (1969)
- (17) Wiedemann, M.: Dimensions of blood vessels from dis-
tributing artery to collecting vein.
Circulat. Res. 12, 375-381 (1963)

Herrn Prof. Dr. K. Kramer danke ich, daß ich an seinem Institut arbeiten konnte.

Herrn Priv. Doz. Dr. H. Schmid-Schönbein möchte ich besonders danken für die Überlassung dieser interessanten Arbeit, sein stetes Interesse und seine Hilfsbereitschaft. Für klärende Gespräche und gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei den Herren Dr. U. Sonnhof, K. Pfafferott, H. Schachtner, Dr. H. Klose und Frl. M. Brandhuber und Frl. A. Prause bedanken.

Für den mechanischen Aufbau und den Bau der Meßkammer, sowie die Hilfe bei der Planung danke ich Herrn W. Klotz und Herrn M. Rastinger sehr.

Lebenslauf

Name: Wolfgang Schlick
Geburtstag: 29. 9. 1941
Geburtsort: Nürnberg

Eltern: Dipl.-Kfm. Hans Schlick († 1. 7. 1961)
Marga Schlick, geb. Stuhlmüller

Schulen: 1947-1952 Volksschule Schwabach und Nürnberg
1952-1961 Realgymnasium Nürnberg
Abitur: 19. 7. 1961

Studium: Physik, WS 61/62 - SS 67 Kiel und Erlangen
Diplom: 19. 7. 1967

Beruf: 1. 10. 67 - 31. 3. 70 Angestellter in der
Industrie

Heirat: 24. 5. 68 mit Frl. Ute Bahrmann
Kind: Anke Petra, geb. 14. 8. 69

Studium: Zahnmedizin, WS 69/70 - SS 74 Hamburg und
München
Staatsexamen: 15. 1. 1975 beendet

